

Цель. Разработать методику для оценки способности сыворотки крови и поликлональных препаратов иммуноглобулинов G разрушать экзополимерный матрикс биопленок и апробировать ее на пациентах с хирургической инфекцией.

Материалы и методы. При разработке и апробации метода мы использовали музейные штаммы *P. aeruginosa* (ATCC 9027) и *S. aureus* (ATCC 6538); сыворотки крови и препараты поликлональных IgG пациентов с хирургической инфекцией и доноров. Выделение иммуноглобулинов проводилось риванол-сульфатным методом с использованием аффинной хроматографии на протеине А стафилококка.

Для сравнения достоверности различия данных в разных группах использовали критерий Манна-Уитни. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Biostat».

Результаты. Для получения биопленки культивировали соответствующий штамм микроорганизмов в течение 48 часов при 37°C на нитроцеллюлозной мембране, помещенной на мясо-пептонный агар. Полученную биопленку смывали с мембраны и добавляли к ней избыток 2% водного раствора конго-красного, который прочно связывается с экзополимерным матриксом. От избытка конго-красного избавлялись 2-х кратной отмывкой 0,9% NaCl с последующим осаждением компонентов биопленки центрифугированием при 1500 об/мин. в течение 60 минут. Полученный раствор содержал частицы матрикса диаметром 80–120 мкм (по данным послойного сканирования на конфокальном микроскопе «LeicaTCSSPEDI 4000»). До использования полученную взвесь замораживали и хранили при температуре –20° С. При приготовлении рабочего раствора для подавления сохранившихся микроорганизмов добавляли азид натрия до концентрации 2 мг/мл. Концентрация сухого вещества в полученном растворе составляла 10 мг/мл.

Реакционная смесь состояла из 0,1 мл препарата иммуноглобулина G в концентрации 1 мг/мл и 0,3 мл рабочего раствора экзополимерного матрикса. После 24 часов инкубации при 37°C в пробирках типа эппендорф производили осаждение не распавшихся компонентов матрикса центрифугированием в течение 10 минут при 10 тыс. об/мин. При разрушении матрикса высвобождается конго-красный и изменяет оптическую плотность раствора. Далее отбирали по 0,15 мл надосадка, помещали в лунки полистиролового планшета для ИФА и определяли оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 492 нм. Уровень активности оценивали по формуле: $\text{Акт} = (\text{Еоп} - \text{Ек}) \times 1000$, где Ек — оптическая плотность раствора в контрольных пробах, где вместо раствора иммуноглобулинов использовался 0,9% NaCl.

При определении способности сыворотки разрушать экзополимерный матрикс реакционная смесь состояла из 0,01 мл сыворотки и 0,39 мл раствора матрикса. Разработанный метод был апробирован на сыворотках крови и препаратах поликлональных IgG полученных от пациентов с хирургической инфекцией и доноров.

У пациентов с хирургической инфекцией способность IgG расщеплять матрикс биопленки *P. aeruginosa* оказалась достоверно ниже ($p < 0,01$), чем у доноров (соответственно 6; 0–13 Еоп, $n=31$ и 16; 11–20 Еоп, $n=15$). При делении пациентов на

группы с острой и хронической хирургической инфекцией уровень активности препаратов IgG как в первой (8, 0–23, $n=21$), так и во второй (2, 0–9, $n=10$) группах был достоверно ниже (соответственно $p < 0,001$ и $p < 0,01$), чем в группе доноров (16, 11–20, $n=15$).

При оценке способности сывороток разлагать экзополимерный матрикс псевдомонад оказалось, что у пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией она практически не отличалась (соответственно 218; 161–259 Еоп и 218; 130–230 Еоп), причем у всех сывороток была достоверно положительна.

При изучении способности сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленок *S. aureus* было установлено, что у пациентов с острой (136, 107,9–176,5, $n=5$) и хронической (146, 89,5–172, $n=6$) хирургической инфекцией данная активность достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в группе доноров (210, 152–225,3, $n=5$).

Выводы.

1. Разработан метод для определения способности сывороток крови и препаратов IgG разрушать экзополимерный матрикс биопленок.

2. Посредством разработанного метода установлено, что сыворотки крови могут разрушать экзополимерный матрикс биопленок *P. aeruginosa* и *S. aureus*, причем в отношении биопленки *S. aureus* эта способность у пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем у доноров.

3. Препараты IgG пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией обладали достоверно ($p < 0,01$) более низкой способностью расщеплять матрикс биопленки *P. aeruginosa* чем IgG доноров.

Литература

1. Косинец, А.Н. Инфекция в хирургии: Руководство. / А.Н. Косинец, Ю.В. Стручков. — Витебск: изд-во ВГМУ, 2004. — 510 с.
2. Оболенский, В.Н., Антибиотикопрофилактика, антибиотикотерапия и микробиологическая ситуация в хирургическом стационаре / В.Н. Оболенский [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. — 2004. — №10. — С.13–19.
3. Davey, M.E., Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Genetics Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 2000. — № 4. — P. 847–867.

РОЛЬ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ В ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

Сергиенко Е.Н.¹, Грибкова Н.В.², Сивец Н.В.²

1. УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
2. ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Беларусь

Острые респираторные инфекции (ОРИ) являются наиболее частой патологией в структуре за-

болеваемости и смертности среди инфекционных заболеваний во всем мире [1,3]. До 90–95% случаев манифестация респираторных инфекций обусловлена вирусами [2,3]. К наиболее распространенным возбудителям острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) относятся: вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, адено-, рино-, бока-, метапневмо-, коронавирусы.

Цель работы: определение роли респираторных вирусов в генезе острых респираторных вирусных инфекций у детей, госпитализированных в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» (главный врач Соколова М.В.).

Материалы и методы. Материалом для лабораторного исследования послужили назофарингеальные мазки, взятые в первые 2 дня от начала заболевания у пациентов в возрасте до 18 лет, поступивших в УЗ «ГДИКБ» с симптомами острой респираторной инфекции за период 2010–2012 гг.

Исследование образцов проводилось в лаборатории гриппа и гриппоподобных заболеваний ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени на наличие генетического материала вирусов гриппа А и В, парагриппа, респираторно-синцитиального (РСВ), аденовирусов, риновирусов, метапневмовирусов, бокавирусов и коронавирусов. В работе использовались диагностические наборы АмплиСенс (Россия). Детекцию продуктов амплификации проводили на приборе RotorGene 6000 (Corbet Research, Австралия).

Результаты и их обсуждение. Методом ПЦР исследовано 607 назофарингеальных мазков, генетический материал респираторных вирусов выявлен в 403 образцах (66%), что подтверждает вирусную этиологию ОРИ в большинстве случаев.

В структуре возбудителей в качестве основных этиологических агентов ОРВИ выявлялись вирусы парагриппа (24%), риновирусы (16%) и РСВ (16%). Частота выявления вирусов гриппа А и бокавирусов составила 11% и 4% соответственно. Адено-, метапневмовирусы и вирус гриппа В выявлялись с одинаковой частотой — по 5%, коронавирус — в 2% случаев.

Анализ структуры ОРВИ в различные эпидемические сезоны показал различный вклад тех или иных респираторных вирусов, что вероятно обусловлено цикличностью их эпидемического распространения. Так, в структуре возбудителей ОРВИ с сентября 2009 г. по май 2010 г. в качестве основных этиологических агентов ОРВИ преобладали РСВ (31%), вирусы парагриппа (27%) и риновирусы (21%). Частота выявления вирусов гриппа А и аденовирусов составила 10% и 5% соответственно. Малоизученные метапневмо- и бокавирусы были выявлены в 1% и 2,5% случаев соответственно. В этиологической структуре ОРВИ с сентября 2010 г. по июнь 2011 г. преобладали заболевания, вызванные вирусами парагриппа, частота выявления которых составила 24,5%, гриппа — 20% и риновирусами — 13%. РСВ-, адено- и бокавирусная инфекции регистрировались практически с одинаковой частотой (4,5%, 5% и 5% соответственно). Метапневмовирус и коронавирус в виде моноинфекции выявлялись в 7% и 3% случаев. В структуре возбудителей ОРВИ с сентября 2011 г. по май 2012 г. преобладали РСВ (31%), вирусы парагриппа (19%) и риновирусы (16%). Частота выявления вирусов гриппа, бока-,

корона- и метапневмовирусов составила 10%, 8%, 4% и 4% соответственно.

Участие нескольких вирусов в возникновении ОРВИ (коинфекция) зарегистрировано в 12% случаев. Детальный анализ всех случаев одновременного инфицирования двумя и более возбудителями показал, что вирусы гриппа А, В, парагриппа и РСВ в большинстве случаев регистрировались в виде моноинфекции (90%, 84%, 81% и 93% соответственно), бокавирус практически с одинаковой частотой выявлялся как в виде моноинфекции (52%), так и коинфекции (48%). В каждом четвертом (25%) случае метапневмовирус и каждом третьем — аденовирус (31%) и риновирус (27%) выявлялись в ассоциации с другими возбудителями ОРВИ.

Кроме того, у 84 пациентов из 403 (21%) с верифицированным диагнозом ОРВИ развились осложнения (отит, пневмония, отит+пневмония, синусит, плеврит). Установлено, что самая высокая частота осложнений регистрировалась при респираторно-синцитиальной вирусной (34%), метапневмовирусной (32%) и бокавирусной (29%) инфекциях, что вероятнее всего связано с тропностью вирусов к нижним дыхательным путям. При этом частота развития осложнений при гриппе составила 12,5%, парагриппе — 13%, аденовирусной инфекции — 16%, риновирусной инфекции — 21%. В случаях коинфицирования частота составила 30%.

Таким образом, проведенный анализ результатов обследования пациентов с ОРИ на респираторную группу вирусов позволяет сделать выводы:

- в большинстве случаев (66%) острые респираторные инфекции имеют вирусную природу,
- в этиологической структуре ОРВИ преобладают негриппозные вирусы, частота которых составила 84%,
- цикличность эпидемического распространения респираторных вирусов определяет структуру ОРВИ, что, несомненно, требует дальнейшего изучения,
- применение метода ПЦР позволяет выявлять широкий спектр респираторных вирусов (грипп А и В, парагриппы, адено-, бока-, рино-, РС-, корона- и метапневмовирусы), в том числе и коинфицирование несколькими вирусами,
- верификация этиологии ОРИ имеет значение не только для определения структуры, но и возможных последствий заболевания.

Литература

1. Клинико-вирусологическая характеристика больных с острой респираторной вирусной инфекцией в эпидемический сезон / Т.А. Бриткова [и др.] // Журнал инфектологии. — 2010. — том 2, № 3. — С. 59–60.
2. Изучение этиологической структуры ОРВИ с помощью ПЦР-диагностики / М.Н. Прадед [и др.] // Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики у детей: Материалы X Конгресса детских инфекционистов России, Москва, 7–9 декабря 2011 г. / Ассоциация педиатров-инфекционистов; под ред. проф. В.Ф. Учайкина. — Москва, 2011. — С. 92.
3. Микрофлора дыхательных путей при гриппе, острых респираторных заболеваниях и их осложнениях / А.С. Паньков [и др.] // Эпидемиология инфекционные болезни. — 2011. — № 2. — С. 42–45.